



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Polyakrylamidhydrogel

- En vetenskapligt baserad behandling av osteoartrit hos häst?

Rebecka Karlsson

*Uppsala
2016*

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien: 2016:45

Polyakrylamidhydrogel- En vetenskapligt baserad behandling av osteoartrit hos häst?

Polyacrylamide hydrogel- An evidence based treatment of osteoarthritis in horses?

Rebecka Karlsson

Handledare: Carina Ingvast Larsson, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Biträdande handledare: Pia Larsson, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Eva Tydén, SLU, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grund nivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2016

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serie: 2016:45

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Polyakrylamidhydrogel, osteoartrit, artificiellt brosk, akrylamid

Key words: Polyacrylamide hydrogel, osteoarthritis, artificial cartilage, acrylamide

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder.....	3
Litteraturöversikt.....	4
Osteoartrit.....	4
Hydrogeler som artificiellt brosk	4
Polyakrylamidhydrogel (PAAG).....	4
Andra hydrogeler.....	5
Verkningsmekanism och effekt.....	5
PAAG och OA	6
Experimentell studie på getter.....	6
Kliniska försök	6
Långtidsverkan	7
Negativ verkan av PAAG och akrylamid.....	7
Stabilitet	8
Akrylamid.....	8
Diskussion	9
Litteraturhänvisning	11

SAMMANFATTNING

En vanlig orsak till hälta hos häst är osteoartrit (OA), en ledsjukdom där ledbrusket kan luckras upp så mycket att det subkondrala benet blottläggs. Nyligen introducerades en medicinteknisk produkt innehållande polyakrylamidhydrogel (PAAG) på marknaden för intraartikulär (ia) behandling av OA. Substansen är förbjuden av Svenska Ridsportsförbundet och av Svensk Travsport på tävlingshästar.

Arbetet syftar till att undersöka om vetenskaplig basis finns för att kunna använda PAAG mot OA hos hästar och frågeställningen innefattar substansens verkningsmekanism, kliniska effekt och toxicitet.

PAAG är en hydrogel och beskrivs ofta som en biokompatibel, icke-toxisk och icke-immunogen gel innehållande mestadels vatten och 2,5 % polyakrylamid. Substansen har under flera år använts inom humanmedicinen som bland annat fyllmedel vid bröst- och ansiktskirurgi. Ett flertal studier har visat att många hydrogeler har fördelaktiga egenskaper som artificiellt brosk vid nedbrytning och skador på egna broskvävnaden, såsom friktionsdämpning och stimulering av kollegenbildning. Verkningsmekanismer finns beskrivna för några av de aktuella hydrogelerna inom den pågående forskningen, exempelvis aktivering av en viktig signalväg för differentiering av kondrocyter. Motsvarande studier saknas dock för PAAG.

Två kliniska studier med ia administrering av PAAG till häst, en under 6 månaders uppföljning och en under 24 månader, samt en experimentell studie på get med inducerad OA, ligger till grund för marknadsföringen till häst. I första studien blev 8 av 12 hästar ohalta, 2 visade förbättring och 2 var fortsatt halta efter 6 månader. I den längre studien var totalt 82,5 % av 43 hästar ohalta vid studiens slut. Den experimentella pilotstudien omfattade 6 getter, 4 behandlades ia med PAAG och 2 ia med fysiologisk koksalt. Behandlingen med PAAG antydde stimulering av kollagenbildning, angiogenes och ett ökat antal synovialceller. Studierna var bristfälliga på många punkter, bland annat storleken på studiepopulation, frånvaro av kontrollgrupper i de kliniska studierna och brist på kritiskt tänkande i diskussionerna.

Redan 2006 förbjöds PAAG i Kina inom bröstkirurgin efter att flertalet fall av komplikationer uppstått, antingen omedelbart efter ingrepp eller upp till flera år senare. Fall där hydrogelen tycks ha brutits ner genom reaktioner i kroppen har observerats och en studie *in vitro* har även kunnat visa att nedbrytning kan ske med hjälp av hydroxylradikaler.

När PAAG bryts ner sönderfaller substansen till akrylamid, en känd neuro- och genotoxisk, reproduktionsstörande och carcinogen substans, som vid flertalet tillfällen orsakat allvarliga skador på djur och människor. Akrylamid är en elektrofil substans och är till skillnad från PAAG oerhört reaktiv på grund av att det kan bilda addukter både med proteiner och DNA. På så vis kan störda proteinfunktioner uppkomma som leder till vävnadsreaktioner och även genotoxicitet.

Slutsatsen som dragits av detta arbete är att hydrogeler som artificiellt brosk har visats ha god potential i flertalet studier. Att använda PAAG som artificiellt brosk är däremot tveksamt på grund av de många bristerna i publicerade studier. Ingen detaljerad verkningsmekanism har påvisats för substansen, endast för nyare hydrogeler, och trots att inga biverkningar uppkom under studierna är säkerheten på lång sikt inte heller klarlagd. Vetenskaplig basis för PAAG's användning i veterinärers kliniska vardag finns därmed inte ännu.

SUMMARY

Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease which fibrillates the cartilage and causes lameness in horses. Recently a new product was introduced as a potential intraarticular (ia) treatment for OA, consisting of polyacrylamide hydrogel (PAAG). The substance is banned in Sweden for use in competing horses.

The aim of this study is to evaluate PAAG to describe its mechanism of action, clinical effects and toxicity. Furthermore to consider whether intraarticular treatment of PAAG holds enough scientific evidence to be used in veterinary practices.

PAAG a hydrogel and is often described as a biocompatible, non-toxic and non-immunogenic polymer gel with 97,5 % water and 2,5 % polyacrylamide. It has been used for several years in human medicine as filler in breast- and facial surgery. Several studies have shown that hydrogels in general has advantageous properties as artificial cartilage, such as friction reduction and stimulation of collagen formation. Mechanisms of action are described for some of the current hydrogels used in ongoing research, such as activation of an important pathway for the differentiation of chondrocytes, but the corresponding research is absent for PAAG.

Two clinical studies in horses with OA, with the duration of 6 and 24 months respectively, and an experimental study in goats with induced OA, supports the use of intraarticular administration of PAAG. The first study showed total recovery for 8 out of 12 horses, whereas 2 horses improved and the last 2 were still lame after 6 months. The two year-study showed a recovery of 82,5 % out of the 43 participating horses. In the pilot study, 6 goats with induced OA was used, 4 was treated with PAAG ia and 2 with saline ia. Signs of increased angiogenesis, collagen production and number of synovial cells were shown in animals treated with PAAG.

The studies were doubtful in many respects, including the size of the study population, the absence of control groups in clinical trials and lack of critical thinking in the discussions.

Already in 2006, PAAG was banned in China for use in breast surgery after several cases of complications, either directly after surgery or several years later. Cases in which the hydrogel appears to have been broken down by reactions in the body have been observed and an *in vitro* study has also been able to show degradation by hydroxyl radicals.

When PAAG is broken down, it disintegrates into acrylamide, a known neurotoxic, genotoxic carcinogen substance with toxic reproductive effects, which has been the cause of many incidents in humans and animals over the years. Acrylamide is an electrophile substance and in contrast to its hydrogel form PAAG, which is relatively stable, acrylamide is very reactive. It can form adducts to both proteins and DNA. In that way, acrylamide can interfere with several important physiological reactions, resulting in tissue degradation and genotoxicity.

The conclusion drawn from this work is that hydrogels has shown to have good potential as artificial cartilage in several studies. To use PAAG however, as artificial cartilage, is doubtful due to insufficient evidence. The mechanism of action is not shown for PAAG and although no adverse effects could be found in the present studies the long term safety has not been established. Scientific evidence for PAAG's use in everyday clinical practices for veterinarians has not yet been established.

INLEDNING

Osteoartrit är vanligt förekommande hos hästar (Kane *et al.*, 2000). Behandlingsmetoder innefattar vanligen icke-steroida antiinflammatoriska läkemedel (NSAID), glukokortikoider, hyaluronsyra, polysulfaterade glukosaminoglykaner (PS-GAG) och/eller glukosamin. Effekten av samtliga preparat varierar mellan individer och för framförallt NSAID och glukokortikoider finns risk för biverkningar på häst, särskilt vid långtidsbehandlingar (Ehrle *et al.*, 2013). År 2012 publicerades den första studien där polyakrylamidhydrogel (PAAG) föreslogs som alternativ behandlingsmetod mot OA. Resultaten beskrevs som lovande (Janssen *et al.*, 2012) och produkten Arthramid Vet. (innehållande PAAG) uppmärksammades av fler aktörer.

Arthramid Vet. är förbjudet att använda som behandling av tävlingshästar i Sverige (Svenska Ridsportförbundet, 2011; Svensk Travsport, 2011). Däremot nämns det inte som en förbjuden substans inom det internationella ridsportsförbundet (FEI Clean Sport, 2016).

Det här arbetet syftar till att undersöka den vetenskapliga grunden bakom PAAG för att granska om det finns evidens nog för veterinärer att använda substansen i sin kliniska vardag. Frågeställningen innefattar därför PAAG's verkningsmekanism och kliniska effekter, eventuella biverkningar och toxisk påverkan, främst på lång sikt.

MATERIAL OCH METODER

För informationssökning användes huvudsakligen databaserna Web of Science och Google Scholar. Sökorden var många och kombinerades på flera sätt. Vanligaste sökningen var: polyacrylamide AND horse* OR equine AND osteoarthritis* OR joint*. Andra viktiga sökord var acrylamide AND stabil* OR toxicity OR toxic AND/ OR "long term". För att ta reda på ytterligare information kring ämnet utökades sökorden även till hydrogel AND "artificial cartilage" och kombinerades med sökord såsom structure och "action mechanism".

LITTERATURÖVERSIKT

Osteoartrit

Osteoartrit (OA), eller ledinflammation, är en degenerativ ledsjukdom i synovialleden som förekommer hos alla djur med skelett av ben. Sjukdomen förknippas främst med hög ålder, men kan drabba även yngre djur. Klinisk bild kan variera från individ till individ och sjukdomen kan vara alltifrån subklinisk till oerhört smärtsam, med deformerad eller förstörd led (Carlson & Weisbrode, 2011). OA uppstår när det blir obalans i de uppbyggande och nedbrytande funktionerna i det extracellulära matrixet. Orsaken är dock inte ännu helt klarlagt (Loeser *et al.*, 2012).

Den inflammatoriska processen börjar oftast i synovian, brosket, ledkapseln eller det subkondrala benet, vilket snabbt leder till en kaskadreaktion av mediatorer och enzymatisk nedbrytning av ledbrusket (Goodrich och Nixon, 2006). Substanter som kinin, histamin, komplementfaktorer och biprodukter från fibrinolytiska system attraherar monocyter och neutrofiler. Dessa frisätter i sin tur lysosomala enzymer och fria syreradikaler (*oxygen-driven free radicals*, ODFR), som kan verka direkt nedbrytande på ledbrusket. Inflammationsprocessen innefattar också frisättningen av cytokiner såsom *tumour necrosis factor* (TNF) och interleukin-1 (IL-1), vilka stimulerar produktionen av matrixnedbrytande enzymer. Stromelysin, kollagenas och gelatinas är exempel på sådana matrixnedbrytande enzymer som verkar genom att bryta ner proteoglykaner och kollagen (Janssen, 1996). Smärtan som associeras med OA har bland annat att göra med att metaboliter från arachidonsyra frisläpps från cellmembranet, som i sin tur leder till produktion av prostaglandiner (främst PGE2 och PGI2). Makroskopisk kan erosioner och fibrillering ses i olika grad. I vissa fall kan nedbrytningen ha gått så långt att det subkondrala benet blottlagts. Broskens yta är ofta mjukare än vanligt på grund av ett ökat vattenupptag till följd av bristande mängd proteoglykaner och kollagen (Goodrich & Nixon, 2006).

De vanligaste behandlingsmetoderna innefattar NSAID, glukokortikoider, hyaluronsyra, PS-GAG och även glukosamin, som ges som kosttillskott (Goodrich & Nixon, 2006). Huruvida de ger tillfredsställande effekt är dock varierande både mellan preparat och mellan individer, och framförallt för NSAID och glukokortikoider finns risker med långtidsbehandling, såsom biverkningar i mag-tarmsystemet och metabola rubbningar (Ehrle *et al.*, 2013).

Hydrogeler som artificiellt brosk

Polyakrylamidhydrogel (PAAG)

PAAG är en polymer bestående av 97,5 % vatten och resterande 2,5 % korslänkad polyakrylamid. Den benämns som en stabil och icke-toxisk substans som har haft omfattande användning framförallt i Kina som bröstimplantat (Christiansen *et al.*, 2013), fyllmedel vid ansiktskirurgi (Zarini *et al.*, 2004) och för att behandla urininkontinens hos kvinnor (Maggiore *et al.*, 2013). I Kina förbjöds dock PAAG att användas redan 2006 på grund av de flertal fall av komplikationer som uppstått (Cheng *et al.*, 2008). Under senare tid har hydrogelen även använts till att behandla OA på häst som den medicintekniska produkten Arthramid Vet. (Tnibar *et al.*, 2015).

Andra hydrogeler

Omfattande forskning vad gäller ledbrosk och hydrogeler, i avsikt regenerera kroppens egna brosk och verka stötdämpande, finns rapporterat för andra hydrogeler än PAAG. Poly(vinyl alkohol)(PVA)-hydrogel en tidigt påkommen kandidat som artificiellt brosk (Bray & Merrill, 1997). PVA har kombinerats i experimentella studier med andra ämnen för att förbättra de stötdämpande och regenerativa egenskaperna och för att underlätta friktion. Akrylamid, som är monomerformen av polyakrylamid, är ett sådant ämne och visades i en *in vitro*-studie förbättra stabilitet och förhindra vattenförlust av PVA-gelen (Bodugoz-Senturk *et al.*, 2009). Det har visats *in vivo* på kanin som modelldjur att en utvecklad hydrogel med dubbel nätverksstruktur av två enklare hydrogeler, visserligen även den innehållande en variant av akrylamidpolymer, kan bidra till spontanläkning av brosk i form av ökad syntes kollagen typ II och aggregat (Yasuda *et al.*, 2009).

Poly(2-akrylamido-2-metylpropansulfonsyra)-gel (PAMP) är en av de aktuella substanserna som ingår i de nyare studierna (Goto *et al.*, 2016), men hydrogeler utan innehåll av akrylamid är också vanligt förekommande. En hydrogel bestående av bl.a. kitin, en aminopolysackarid, visade i en nyligen publicerad studie indikationer på angiogenes och osteocytdifferentiering (Kumar *et al.*, 2016). Poly(l-lysin) inkorporerat i oligo(poly(etylen-glykol)- fumarat) (OPF)-baserad hydrogel är ytterligare ett av många exempel på ämnen som verkar tidigt inducerande på kollagen typ II och aggregat-uttryck i jämförelse med kontroller (Lam *et al.*, 2016).

Verkningsmekanism och effekt

Någon specifik verkningsmekanism för PAAG har inte kunnat hittas i litteraturen, men substansen har rapporterats som en biokompatibel komponent som integrerar med mjukvävnad (Fernandez-Cossio & Castano-Oreja, 2006). Att ämnet inducerar angiogenes och kollagenbildning vid OA har rapporterats i en mindre omfattande experimentell studie på get (Tnibar *et al.*, 2014).

För hydrogeler över lag är tanken att de skall verka friktionsdämpande och helst erhålla bioaktiva egenskaper för uppbyggnad av egna broskvävnaden (Goto *et al.*, 2016; Vikingsson *et al.*, 2016). På grund av att hydrogeler generellt är biokompatibla, flexibla och har en struktur som tillåter modifiering för att kunna efterlikna naturliga friktionsdämpande mekanismer som erhålls av brosk, är de lämpliga kandidater inom forskning på brosk och ledproblem (Katta *et al.*, 2007). Den tredimensionella strukturen hos polymerer bildar ett fördelaktigt nätverk (beskrivet som *scaffold design* i engelsk litteratur) med porer som fylls upp med vatten. Kombinerat med olika co-polymerer åstadkoms olika typer av porösa nätverk. De möjliggör syntes av broskmatrix inuti *scaffold*-porerna och de mekaniska egenskaperna som erhålls liknar därmed äkta ledbrosk. En bra *scaffold*-polymer ska kunna stå emot det tryck som åstadkoms i en led, samt inneha egenskaper som inducerar kondrocytproliferation (Vikingsson *et al.*, 2016).

Elasticitet i omgivande struktur har i cellkultur med mesenkymala stamceller visat sig vara en avgörande faktor för vilken cellinje som utvecklas. Mjuk matrix, likt hjärnvävnad, stimulerar utveckling av neurogena celler, något stelare matrix inducerar utveckling av myocyter och strukturer av ännu stelare karaktär, likt kollagen ben, stimulerar osteogen utveckling (Engler *et al.*, 2006). Då elasticitet visat sig vara medverkande i utveckling av olika cellinjer finns

hypoteser om att implantat av bioaktiva elastiska geler kan påverka differentieringen av kondrocyter och därmed regenerera skadad broskvävnad (Kitamura *et al.*, 2011).

För PAMP-hydrogeler finns en mer detaljerad verkningsmekanism beskriven. I cellkultur med kondrocyters progenitorceller (ATDC5-cellinjer) visade realtids-PCR, microarray och Western blot-analyser att PAMP-gel leder till aktivering av en viktig signalväg för differentiering av kondrocyter (TGF- β /BMP). Även fler signalvägar relaterade till differentieringen aktiverades och uttryck av flera viktiga gener ökade signifikant i PAMP-cellkulturen jämfört med andra cellkulturer. TGF- β /BMP stimulerar mRNA-uttryck av kollagen typ II och aggrecan, en viktig komponent i det extracellulära matrixet i brosk (Goto *et al.*, 2016).

PAAG och OA

Experimentell studie på getter

OA inducerades hos totalt 6 getter genom operation av mediala kollateralligamentet, mediala menisken och snitt i broskytan på tibias mediala yta. Efter ingreppet som utfördes på djurens vänstra knäled tilläts getterna fri rörelse i 3 månader, innan de delades in i fall-(n=4) eller kontrollgrupp (n=2). Fallgruppen injicerades intraartikulärt med PAAG medan kontrollen behandlades med fysiologisk koksaltlösning. Undersökningar gjordes sedan 1, 2 och 4 månader efter behandlingen. Getterna bedömdes av blindade observatörer, vid rörelse på marken och på löpband. Hematologi, biokemi och akutfasproteiner bedömdes också, men författarna specificerar inte tydligare hur det utförts. För att kunna undersöka histopatologin och synliga förändringar avlivades getterna efter sista observationen, sju månader efter operationen (Tnibar *et al.*, 2014).

Efter sista observationen bedömdes 3 av de 4 PAAG-behandlade getterna ohalta, medan den 4:e var fortsatt halt. Ingen av de två kontroldjuren visade någon förbättring av håltan. Hematologi, biokemi och akutfasproteiner låg inom de normala värdena för båda grupperna. Magnetrontgen visade att en av getterna i PAAG-gruppen hade förvärrade OA-lesioner, medan OA-lesionerna hos de övriga getterna i fallgruppen hade stabiliserats eller minskat. Båda kontrollerna visade en ökning av OA-lesioner. Histopatologisk undersökning antydde att angiogenes, kollagenbildning och ökat antal synovialceller var mer framträdande i fallgruppen än hos de båda kontrollgetterna. Dock redovisas ingen statistik eller deskriptiv analys över de fynd som observerades (Tnibar *et al.*, 2014).

Kliniska försök

I Tyskland observerades 12 hopphästar med konstaterad OA under sex månaders tid, efter en injektion med 1 ml PAAG (Arthramid Vet). De flesta hästarna var varmblood och åldern låg mellan 4 och 14 år. För att delta i studien skulle hästarna ha påvisats halta från en led och behandlats minst två gånger med hyaluronsyra, glukokortikoider och/eller interleukin-1 receptor antagonist (IRAP) utan förbättring. De hade dessutom röntgats och för att inkluderas i studien skulle två av flera kriterier uppfyllas, bl.a. ökad ledfyllnad, subkondrala benförändringar, broskskador och/eller bencystor. Hästar med ledinfektion eller hudinfektion

nära leden uteslöts ur studien. Någon kontrollgrupp fanns inte med i studien (Janssen *et al.*, 2012).

Efter behandling med PAAG ordinerades hästarna fem dagars boxvila, följt av två veckor med 20 minuters promenad, två gånger dagligen. Därefter inleddes rehabiliteringen med en veckas skritt- och travträning. Första undersökningen gjordes efter en månad då samtliga hästar genomgått lätt arbete. Vid denna undersökning var 4 av hästarna (33 %) ohalta, 3 hästar visade reducerad hälta och 4 (33 %) visade ingen förändring. En häst undersöktes inte (Janssen *et al.*, 2012).

Efter sex månader undersöktes hästarna igen och 8 av de totalt 12 djuren var fria från hälta och igångsatta på hoppbanan igen, 2 visade reducerad hälta och 2 hade inte fått någon effekt av behandlingen. Inga biverkningar upptäcktes under de sex månader som djuren följdes upp, men författarna uttryckte behovet av ytterligare studier för att undersöka säkerhet, verkningsmekanism och långvarig effekt (Janssen *et al.*, 2012).

Långtidsverkan

För långvarig effekt av PAAG undersöktes hästar på liknande sätt som i den första studien, med skillnaden att de följdes upp i hela två år. Försöket pågick mellan åren 2010 och 2014 och utfördes på tre djurkliniker i Danmark och två i Tyskland. Inklusionskriterium var påvisad hälta från en led och hästarna fick inte vara behandlade mot OA (t.ex. med glukokortikoider, NSAID eller hyaluronsyra) inom två månader före behandling med PAAG. Hästar med OA i flera ben eller ledinfektion exkluderades ur studien. Detsamma gällde hästar som genomgått ledoperation, inklusive artroskopi inom tre månader före studien (Tnibar *et al.*, 2015).

I studien ingick 43 hästar. Vid dag noll injicerades 2 ml PAAG (Arthramid Vet) i påverkad led och hästarna fick sedan på vila i två veckor med enbart 10-15 minuters promenad per dag, vilket utökades till 20-30 minuters promenad, eller utgång i liten hage, de efterföljande två veckorna. Undersökningar utfördes sedan vid 1, 3, 6, 12 och 24 månader efter den intraartikulära injektionen. Klinikerna kände inte till identiteten hos den häst de undersökte eller om den var behandlad eller inte. Samtliga hästar på de olika klinikerna undersöktes under liknande förhållanden och enligt standardiserade metoder (Tnibar *et al.*, 2015).

Efter två års uppföljning från akut hälta i led var 82,5 % av hästarna icke-halta och statistiska beräkningar tydde på signifikant minskad hälta ($P < 0.0001$) i jämförelse med status innan behandlingen. Majoriteten (90 %) av hästägarna var nöjda eller mycket nöjda med effekten (Tnibar *et al.*, 2015).

Negativ verkan av PAAG och akrylamid

Inga biverkningar har noterats efter PAAG-behandling i leder med den längsta uppföljningsperioden på två år (Tnibar *et al.*, 2015). Inom andra områden där PAAG tillämpats har substansen dock gett upphov till flertalet biverkningar, särskilt vid användning som fyllmedel i exempelvis bröstimplantat och ansiktsinjektioner. Tidiga biverkningar som påvisats är inflammation, asymmetri, infektion och abscessbildning och gelmigration. Även

anafylaktisk chock har rapporterats. Vid histologisk undersökning påvisades nekroser, granulombildning och fibros i drabbad vävnad (Manafi *et al.*, 2010)

Även i de fall där ingrepp kortsiktigt tycks ha varit lyckade har fallrapporter inkommit om bieffekter flera år efter operation eller injektion med PAAG. Två fall inom ansiktskirurgin beskrivs i en rapport där effekter PAAG, såsom gelnmigration, vävnadsinfektion och nekrosbildning, observerades tre år efter att hydrogelen injicerats (Lieu & Cheung, 2010). PAAG användes flitigt som implantat i Kina från 1997, men förbjöds 2006 på grund av de flertal fall av komplikationer som uppstått (Cheng *et al.*, 2008). Ett av dessa fall dök upp hela sju år efter bröstimplantat och visade nedbrytning av vävnad på grund av PAAG. När implantaten togs ut var hydrogelen inte längre genomskinlig och viskös, utan uppvisade gulaktig färg och erhöll konsistens lik gummi. En trolig förklaring var att PAAG troligen brutits ned genom reaktion i kroppen och att akrylamidmonomerer frigjorts och orsakat nedbrytning av vävnad (Xu *et al.*, 2012).

Stabilitet

PAAG beskrivs i dagsläget som en atoxisk och stabil substans, trots att *in vitro*-nedbrytning av PAAG till sin toxiska monomer akrylamid i närvaro av hydroxylradikaler har påvisats (Wan *et al.*, 2005) och fri akrylamid finns även påvisat i en oanvänd medicinteknisk produkt av PAAG (Xi *et al.*, 2006).

Akrylamid

Det är väldokumenterat att akrylamid orsakar neurotoxiska, genotoxiska, reproduktionsstörande och carcinogena effekter. Akrylamid är liten organisk molekyl med hög vattenlöslighet, en egenskap som gör att den lätt kan absorberas och distribueras i kroppen. Metabolism sker huvudsakligen genom glutathion-konjugering (till 60 %) och substansen elimineras tills största del via urinen inom 24 timmar. Studier har visat att viss ackumulering sker i testikeln och kan stanna kvar i upp till 10 dagar (Dearfield *et al.*, 1988).

Akrylamid tillhör gruppen toxiska elektrofiler och den toxiska effekten uppstår genom bildning av proteinaddukter, vilket stör proteiners uppbyggnad och funktion, som i sin tur skadar cellens organeller och/eller metabola processer, vilket leder till bl.a. nekroser. Toxiska effekter erhålls även av en metabolit, glycamid, som även den kan bilda addukter till DNA (LoPachin & DeCaprio, 2005).

Ett exempel på akrylamids toxiska verkan i vår närhet är händelserna vid Hallandsåsen i mitten av 90-talet där sprickor vid ett tunnelbygge lagades med Rhoca Gil, ett tätningsmedel innehållande akrylamid. Ämnet förorenade avloppsvatten som rann ut i Vadåsen och förgiftade både fiskar och betande kor, som drabbades akut av förlamning. Senare konstaterades även nervskador hos personalen som arbetat med att täta tunneln. I oktober 1997 stoppades tunnelbygget av Banverket och Skanska och en sanering påbörjades för att området senare skulle kunna friförklaras (Trafikverket, 2014).

DISKUSSION

Utifrån resultaten från de två studierna på häst och pilotstudien på get konstaterade författarna att intraartikulär behandling med PAAG verkar effektivt mot hälta associerad med OA och att det är både säkert och långtidsverkande (Tnibar *et al.*, 2015). Efter kritisk granskning finns det dock en hel del brister att nämna. Viktigast är de studier och fall som tyder på att PAAG kan ha allvarliga toxiska effekter i längden eftersom ämnet är en polymer av elektrofilen akrylamid, en känd neuro- och genotoxisk och carcinogen substans (LoPachin & DeCaprio, 2005). Fallrapporter har visat allvarliga biverkningar av PAAG efter bland annat tre år hos kvinnor med ansiktinjektioner (Lieu & Cheung, 2010). I fallet med den guldfärgade, gummiartade hydrogelen som opererades ut efter bröstimplantat uppkom effekter hela sju år efter ingrepp (Xu *et al.*, 2012), vilket motsäger argumentet att PAAG är en atoxisk och stabil substans. Två år är därför inte nog för att kunna bevisa säkerheten hos substansen.

För att göra en korrekt bedömning av PAAG's effekter vid behandling mot OA bör de publicerade studierna först och främst utvärderas med avseende på studiedesign. Pilotstudien på get (Tnibar *et al.*, 2014) gav förvisso en bild av vad som skett i leden på grund av att djuren avlivades för obduktion, men 6 getter, varav 2 kontroller är ett oroväckande lågt antal. För övrigt var studien randomiserad och observatörerna var blindande, men med så få djur är det svårt att dra korrekta slutsatser.

I studien av Janssen *et al.* var förvisso 8 av de 12 hästarna ohalta efter sex månader, men även här var studiepopulationen för liten för att kunna dra några säkra slutsatser. De saknade även kontrollgrupper, vilket är en stor svaghet i studien. Sjukdomsförloppet hos OA varierar hos individer och det går inte klart att säga att PAAG haft den förbättrande effekten utan kontrollgrupp. Majoriteten av hästarna tillfrisknade under behandlingen, men det var först efter flera månader. Efter en månad var endast 4 hästar utan hälta vid undersökningen. Att fler tillfrisknade med tiden skulle kunna förklaras av det noggranna upplägget av vila och igångsättning, det vill säga att hästarna, trots höga inklusionskrav, återhämtat sig till följd av rehabilitering. Det går inte att hävda att PAAG haft effekt enbart på grund av att tidigare behandlingar visat sig ineffektiva. Kontrollgrupper skulle ha varit nödvändiga för att kunna utesluta effekten av rehabilitering.

I tvåårsstudien (Tnibar *et al.*, 2015) saknades också kontrollgrupper. Visserligen ingick 43 hästar i studien och klinikerna var blindade vid observation, men även här hade troligen vila och rehabilitering en god effekt. Dessutom kan eventuell effekt av läkemedelsbehandling utförd innan injicering med PAAG inte uteslutas eftersom hästar exkluderades endast om behandlingen var utförd inom två månader före studien. Sådana aspekter tar författarna inte upp i sin diskussion och bristen av kritisk analys anser jag oroväckande i sig. De motiverar heller inte valet av substans eller nämner det faktum att PAAG förbjöds i Kina redan 2006, på grund av att toxiska effekter upptäcktes lång tid efter applicering av PAAG (Cheng *et al.*, 2008).

Akrylamid är en toxisk substans och är till skillnad från PAAG väl studerad. Hallandsåsen är bara ett av många exempel där giftet haft allvarliga konsekvenser. Det finns dessutom indikationer att akrylamid finns i fri form både i PAAG-produkter och att PAAG kan brytas ner i vävnaden av syreradikaler som bildas vid inflammation (Xi *et al.*, 2006; Wan *et al.*,

2005; Goodrich och Nixon, 2006). Av den anledningen borde samtliga ämnen innehållande en sådan substans utvärderas grundligt före ny introduktion på marknaden. I de studier som gjorts på getter och hästar hade jag velat veta vad som motiverat valet att använda PAAG i projekten. Bakgrundsmaterialet var bristfälligt i samtliga rapporter och trots att de tar upp att gelen använts inom mjukvävnadskirurgi inom humanmedicinen i många år nämner de inte de biverkningar som uppkommit (Manafi *et al.*, 2010).

Omfattande forskning finns rapporterad vad gäller artificiellt brosk och hydrogeler, både *in vivo* och *in vitro*. PAMP-gel har till skillnad från PAAG en nästintill klarlagd verkningsmekanism, och studierna är både nyare och mer detaljerade. Säkerheten är dock inte klarlagd och faktum kvarstår att gelen innehåller akrylamid som komponent, vilket är anmärkningsvärt med tanke på dess toxicitet. PAMP och andra, aktuella akrylamidhydrogeler är dock mycket mer lämpliga alternativ än PAAG på grund av att det finns tydliga vetenskapliga belegg för dess effekt och nyare forskning (Yasuda *et al.*, 2009; Goto *et al.*, 2016). PAAG är en gammal hydrogel som av flera skäl förbjöds inom bröstkirurgin i Kina redan 2006 och nu ersatts av andra preparat. Det finns därför ingen anledning att inte följa utvecklingen och utföra kliniska studier på de hydrogeler som är aktuella inom grundforskningen. Förutom PAMP-gel finns dessutom ännu nyare alternativ som inte innehåller akrylamid alls (Lam *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2016).

Syftet med detta arbete var att undersöka om det finns tillräcklig vetenskaplig grund för veterinärer att använda PAAG i sin kliniska vardag och med stöd i litteraturen kan jag dra slutsatsen att ytterligare studier krävs innan PAAG kan anses effektivt och säkert. Ingen detaljerad verkningsmekanism har studerats för substansen, enbart för nyare hydrogeler, och trots att inga biverkningar uppkom under studierna är säkerheten på lång sikt inte heller klarlagd. De studier som gjorts i försök att bevisa den kliniska effekten har allvarliga brister på grund av det begränsade antalet djur och den bristande studiedesignen, framförallt vad gäller avsaknaden av kontrollgrupper.

Jag anser att det inte är försvarbart att använda ett redan uppmärksammat skadligt, och i vissa länder, förbjuden substans i klinisk verksamhet. Fokus borde istället läggas på nyare hydrogeler som hittills visats effektiva och säkra i *in vivo*-studier. Där finns stor utvecklingspotential och de studerade verkningsmekanismerna ger en god grund för vidare forskning.

LITTERATURHÄNVISNING

- Bodugoz-Senturk, H.; Macias, C.E.; Kung, JH.; Muratoglu, O.K. (2009). Poly(vinyl alcohol)-acrylamide hydrogels as load-bearing cartilage substitute. *Biomaterials*, 30:589-596.
- Bray, J.C. & Merrill, E.W. (1997). Poly(vinyl alcohol) hydrogels for synthetic articular-cartilage material. *Journal of Biomedical Materials Research*, 7:431-443.
- Carlson, C.S. & Weisbrode, S.E. (2011). Bones, Joints, Tendons, and Ligaments. 16: James F. Zachary and M. Donald McGavin, *Pathologic basics of Veterinary Disease*, 5th edition. Missouri: Mosby, 984-985.
- Cheng, M.S.; Ho, C.M. & Cheung, W.Y. (2008) Polyacrylamide hydrogel injection for breast enhancement: should it be banned? *Plastic & Reconstructive Surgery*, 122:94E-95E.
- Christensen, L.H.; Breiting, V.B.; Aasted, A.; Jorgensen, A. & Kebuladze, I. (2003). Long-term effects of polyacrylamide hydrogel on human breast tissue. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 111:1883-1890.
- Dearfield, K.L.; Abernathy, C.O.; Ottley, M.S.; Brantner, J.H. & Hayes, P.F. (1988). Acrylamide- It's metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity and carcinogenicity. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 195:45-77.
- Engler, A.J.; Sen, S.; Sweeney;H.L. & Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell press*, 126:677–689.
- Ehrle, A.; Fuerst, A. & Lischer, C. (2013). Efficacy and adverse effects of joint medication in the horse – A review of the literature – Part 1: Conventional joint medication and the risks involved with joint injection in the horse. *Pferdeheilkunde*, 29:212-218.
- FEI Clean Sport: Databas. Sökord: Arthramid OR polyacrylamide
<http://prohibitedsubstancesdatabase.feicleansport.org/> [2016-02-22]
- Fernandez-Cossio, S. & Castano-Oreja, M. (2006). Biocompatibility of two novel dermal fillers: Histological evaluation of implants of a hyaluronic acid filler and a polyacrylamide filler. *Plastic & Reconstructive Surgery*, 117:1789-1796.
- Goodrich, L.R.. & Nixon, A.J. (2006). Medical treatment of osteoarthritis in the horse – A review. *The Veterinary Journal*, 171:51-69.
- Goto, K.; Kimura, T.; Kitamura, N.; Semba, S.; Ohmiya, Y.; Aburatani, S.; Matsukura, S.; Tsuda, M.; Kurokawa, T.; Gong, J.P.; Tanaka, S. & Yasuda, K. (2016). Synthetic PAMPS gel activates BMP/Smad signaling pathway in ATDC5 cells, which plays a significant role in the gel-induced chondrogenic differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104:734-746.
- Janssen, I.; Koene, M. & Lischer, C. (2012) Intraarticular application of polyacrylamide hydrogel as a treatment of osteoarthritis in the distal interphalangeal joint: case series with 12 horses. *Pferdeheilkunde*, 28:650-656.
- Kane, A.J.; Trau-Dargatz, J.L.; Losinger, W.C.; Garber, L.P.; Wagnre, B.A. & Hill, G.W. (2000). A Cross-Sectional Survey of Lameness and laminitis in US horses. *Proceedings of the 9th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*, P.441.
- Katta, J.K.; Marcolongo, M.; Lowman, A. & Mansmann K.A. (2007). Friction and wear behavior of poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl pyrrolidone) hydrogels for articular cartilage replacement. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 83A:471-479.
- Kitamura, N.; Yasuda, K.; Ogawa, M.; Arakaki, K.; Kai, S.; Onodera, S.; Kurokawa, T. & Gong, J.P. (2011). Induction of Spontaneous Hyaline Cartilage Regeneration Using a Double-Network Gel: Efficacy of a Novel Therapeutic Strategy for an Articular Cartilage Defect. *American journal of sports medicine*, 39:1160-1169.

- Kumar, A.; Sivashanmugam, A.; Deepthi, S.; Bumgardner, J.D.; Nair, S.V. & Jayakumar, R. (2016). Nano-fibrin stabilized CaSO₄ crystals incorporated injectable chitin composite hydrogel for enhanced angiogenesis & osteogenesis. *Carbohydrate Polymers*, 140:144-153.
- Lam, J.; Clark, E.C.; Fong, E.L.S; Lee, E.J.; Lu, S.; Tabata, Y. & Mikos, A.G. (2016). Evaluation of cell-laden polyelectrolyte hydrogels incorporating poly(L-Lysine) for applications in cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 83:332-46.
- Umberto, L.R.M; Franco, A.;Mauro, M.; Maurizio, G.; Pier Luigi, V. & Simone, F. (2013). Outpatient periurethral injections of polyacrylamide hydrogel for the treatment of female stress urinary incontinence: effectiveness and safety. *Archives of gynecology and obstetrics*, 288:131-7.
- Liu, H.L. & Cheung, W.Y. (2010) Complications of polyacrylamide hydrogel (PAAG) injection in facial augmentation. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 63: E9-E12.
- Loeser, R.F., Goldring, S.R., Scanzello, C.R. & Goldring, M.B. (2012) Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis and Rheumatism*, 64:1697-1707.
- LoPachin, R.M. & DeCaprio, A.P. (2005) Protein Adduct Formation as a Molecular Mechanism in Neurotoxicity. *Toxicological sciences*, 86: 214–225.
- Manafi, A.; Emani, H.A.; Pooli, A.H.; Habibi, M.; Saidian, L. (2010). Unacceptable Results with an Accepted Soft Tissue Filler: Polyacrylamide Hydrogel. *Aesthetic Plastic Surgery*, 37:413-422.
- Cheng, N.; Wang, Y.; Wang, J.; Zhang, X. & Zhong, H. (2002). Complications of Breast Augmentation with Injected Hydrophilic Polyacrylamide Gel. *Aesthetic Plastic Surgery*, 26:375-382.
- Svensk Travsport (2011-01-23). *Polyakrylamidhydrogel (Arthramid Vet) ej till tävlingshäst*. <https://www.travsport.se/article/2.630/1.2180;jsessionid=zyDvWLLVGys3X8zH6TbKsj49PD1pv28NKqG2b5GknxWt1C3z1YQG!1922252181>[2016-02-22]
- Svenska Ridsportförbundet (2011-01-15) *Polyakrylamidhydrogel (Arthramid Vet) ej till tävlingshäst*. <http://www3.ridsport.se/Tavling/Nyheter/2011/01/PolyakrylamidhydrogelArthramidVetejilttavlinggshast/> [2016-02-22]
- Tnibar, A.; Persson, A.B.; Nielsen, H.; Svalastoga, E.; Westrup, U.; McEvoy, F.; Knudsen, J.; Thomsen, P.D.; Berg, L.C.; Jacobsen, S. & Christensen, L.H.. (2014). Evaluation of a polyacrylamide hydrogel in treatment of induced osteoarthritis in a goat model: A randomized controlled pilot study. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22: 477-477.
- Tnibar, A.; Schougaard, H.; Camitz, L.; Rasmussen, J.; Koene, M.; Jahn, W. & Markussen, B. (2015). An international multi-centre prospective study on the efficacy of an intraarticular polyacrylamide hydrogel in horses with osteoarthritis: a 24 months follow-up. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57: 20.
- Trafikverket (2014-10-15) *Lärdomar efter Rhoca Gil*. <http://www.trafikverket.se/nara-dig/Skane/projekt-i-skane-lan/Hallandsas/Bakgrund/Projekthistorik/Lardomar-efter-Rhoca-Gil/> [2016-02-29]
- United States Department of Agriculture (April 2000) *Lameness & Laminitis in U.S horses*. https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/equine/downloads/equine98/Equine98_dr_Lameness.pdf [2016-02-22]
- Vikingsson, L.; Antolinos-Turpin, C.M.; Gómez-Tejedor, J.A.; Gallego Ferrer, G. & Gómez Ribelles, J.L. (2016). Prediction of the “*in vivo*” mechanical behavior of biointegrable acrylic macroporous scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 61: 651–658.
- Wan, Z.Y.; Xi, T.F.; Zhao, P.; Fan, C.X.; Sun, Y. & Feng, Z.G. (2005). In vitro degradation of medical polyacrylamide hydrogel I. Oxidation. *Key Engineering Materials*, 288-289:397-400.
- Xu, C.; Cao, M.; Bao, B.; Li, H. & Yin, D. (2012). Tissue Degeneration 7 Years After Breast Augmentation With Injected Polyacrylamide Hydrogel (PAAG). *Aesthetic Plastic Surgery*, 36:160-162.

Yasuda, K.; Kitamura, N.; Gong, J.P.; Arakaki, K.; Joon Kwon, H.; Onodera, S.; Chen, Y.M.; Kurokawa, T.; Kanaya, F.; Ohmiya, Y. & Osada, Y. (2009). A Novel Double-Network Hydrogel Induces Spontaneous Articular Cartilage Regeneration in vivo in a Large Osteochondral Defect. *Macromolecular Bioscience*, 9:307-316.

Zarini, E.; Supino, R.; Pratesi, G.; Laccabue, D.; Tortoreto, M.; Scanziani, E.; Ghisleni, G.; Paltrinieri, S.; Tunesi, G. & Nava, M. (2004). Biocompatibility and tissue interactions of a new filler material for medical use. *Plastic & Reconstructive Surgery*, 114:934-942.